

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

**Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.**

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORLED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

766.37

#4
Priority Doc
10/11/00
PATENT APPLICATION



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:)
SATOSHI KOIZUMI, ET AL.) : Examiner: Not Yet Assigned
Application No.: N/Y/A) : Group Art Unit: N/Y/A
Filed: Currently herewith) :
For: PROCESS FOR PRODUCING) :
GDP-FUCOSE) : August 2, 2000

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

CLAIM TO PRIORITY

Sir:

Applicants hereby claim priority under the International Convention and all rights to which they are entitled under 35 U.S.C. § 119 based upon the following Japanese Priority Application:

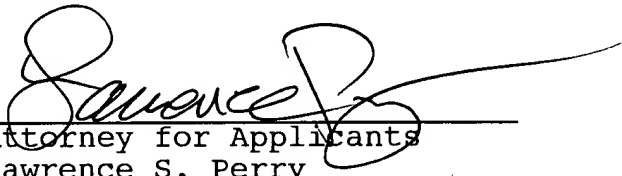
No. 11-225889 filed August 10, 1999.

A certified copy of the priority document is enclosed.

The Examiner is respectfully requested to acknowledge receipt of the claim to priority and priority document.

Applicants' undersigned attorney may be reached in our New York office by telephone at (212) 218-2100. All correspondence should continue to be directed to our below listed address.

Respectfully submitted,


Attorney for Applicants
Lawrence S. Perry
Registration No. 31,865

FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO
30 Rockefeller Plaza
New York, New York 10112-3801
Facsimile: (212) 218-2200

LSP\ac

NY_MAIN 100962 v 1

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

09/631,709
#4



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 1999年 8月10日

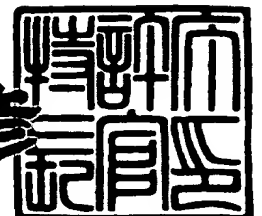
出願番号
Application Number: 平成11年特許願第225889号

出願人
Applicant (s): 協和醗酵工業株式会社

2000年 6月23日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3046597

【書類名】 特許願

【整理番号】 H11-0781J2

【提出日】 平成11年 8月10日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 19/26

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会
社 東京研究所内

【氏名】 小泉 聡司

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会
社 東京研究所内

【氏名】 長野 宏

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会
社 東京研究所内

【氏名】 遠藤 徹夫

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会
社 東京研究所内

【氏名】 田畑 和彦

【発明者】

【住所又は居所】 山口県防府市協和町 1 番 1 号 協和醗酵工業株式会社
技術研究所内

【氏名】 尾崎 明夫

【特許出願人】

【識別番号】 000001029

【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

【代表者】 平田 正

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008187

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 図面 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 GDP-フコースの製造法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 グアノシン-5'-ニリン酸-4-ケト-6-デオキシマンノース（以下、GKDMと略記する）をグアノシン-5'-ニリン酸フコース（以下、GDP-フコースと略記する）に変換する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源およびGKDMを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中でGDP-フコースを生成蓄積させ、該水性媒体中からGDP-フコースを採取することを特徴とするGDP-フコースの製造法。

【請求項2】 グアノシン-5'-三リン酸（以下、GTPと略記する）の前駆物質からGTPを生成する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、および糖とGTPからグアノシン-5'-ニリン酸-4-ケト-6-デオキシマンノース（以下、GKDMと略記する）を生成する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、これらの酵素源、GTPの前駆物質および糖を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中でGKDMを生成蓄積させた後、GKDMをグアノシン-5'-ニリン酸フコース（以下、GDP-フコースと略記する）に変換する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、蓄積したGKDMをGDP-フコースに変換することによりGDP-フコースを該水性媒体中に生成蓄積させ、該水性媒体中からGDP-フコースを採取することを特徴とするGDP-フコースの製造法。

【請求項3】 グアノシン-5'-三リン酸（以下、GTPと略記する）の前駆物質からGTPを生成する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、および糖とGTPからグアノシン-5'-ニリン酸-4-ケト-6-デオキシマンノース（以下、GKDMと略記する）を生成する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、これらの酵素源、GTPの前駆物質および糖を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中でGKDMを生成蓄積させ、該水性媒体中からGKDMを採取することを特徴とするGKDMの製造法。

【請求項4】 培養液の処理物が、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液

を遠心分離して得られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩砕処理物、該菌体の溶媒処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の蛋白質分画物、該菌体の固定化物あるいは該菌体より抽出して得られる酵素標品であることを特徴とする、請求項 1、2 または 3 記載の製造法。

【請求項 5】 GTP の前駆物質がグアニン、キサンチン、ヒポキサンチン、グアノシン、キサントシン、イノシン、グアノシン-5' - リン酸、キサントシン-5' - リン酸、イノシン-5' - リン酸である請求項 2 または 3 記載の製造法。

【請求項 6】 糖がグルコース、フラクトース、マンノースから選ばれる糖である請求項 2 または 3 記載の製造法。

【請求項 7】 GTP の前駆物質から GTP を生成する能力を有する微生物がコリネバクテリウム属に属する微生物から選ばれる微生物であることを特徴とする請求項 2 または 3 記載の製造法。

【請求項 8】 コリネバクテリウム属に属する微生物が、コリネバクテリウム・アンモニアゲネスであることを特徴とする請求項 7 記載の製造法。

【請求項 9】 糖と GTP から GKDM を生成する能力を有する微生物が、1 または 2 種類以上の微生物より構成されることを特徴とする請求項 2 または 3 記載の製造法。

【請求項 10】 微生物がエシェリヒア属およびコリネバクテリウム属に属する微生物から選ばれる 1 または 2 種類以上の微生物であることを特徴とする請求項 9 記載の製造法。

【請求項 11】 エシェリヒア属に属する微生物がエシェリヒア・コリである請求項 10 記載の製造法。

【請求項 12】 コリネバクテリウム属に属する微生物が、コリネバクテリウム・アンモニアゲネスであることを特徴とする請求項 10 記載の製造法。

【請求項 13】 糖と GTP から GKDM を生成する能力を有する微生物が、グルコキナーゼ（以下、g l k と略記する）、ホスホマンノムターゼ（以下、m a n B と略記する）、マンノース-1-リン酸グアニリルトランスフェラーゼ（

以下、manCと略記する)、ホスホグルコムターゼ(以下、pgmと略記する)、ホスホフラクトキナーゼ(以下、pfkと略記する)およびGDP-マンノース4,6-デヒドラターゼ(以下、gmdと略記する)から選ばれる1つ以上の酵素の活性の強い微生物であることを特徴とする請求項2または3記載の製造法。

【請求項14】 微生物が、glkをコードする遺伝子、manBをコードする遺伝子、manCをコードする遺伝子、pgmをコードする遺伝子、pfkをコードする遺伝子およびgmdをコードする遺伝子から選ばれる1種類以上の遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有する1種類以上の微生物から構成されることを特徴とする請求項13記載の製造法。

【請求項15】 glkをコードする遺伝子、manBをコードする遺伝子、manCをコードする遺伝子、pgmをコードする遺伝子、pfkをコードする遺伝子およびgmdをコードする遺伝子がエシェリヒア・コリ由来の遺伝子であることを特徴とする請求項14記載の製造法。

【請求項16】 GKDMをGDP-フコースに変換する能力を有する微生物が、GKDMエピメラーゼ/レダクターゼ(以下、wcaGと略記する)活性の強い微生物であることを特徴とする請求項1または2記載の製造法。

【請求項17】 微生物がwcaGをコードする遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有する微生物であることを特徴とする請求項16記載の製造法。

【請求項18】 wcaGをコードする遺伝子がエシェリヒア・コリ由来の遺伝子であることを特徴とする請求項17記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はグアノシン-5'-二リン酸フコース(以下、GDP-フコースと略記する)およびグアノシン-5'-二リン酸-4-ケト-6-デオキシマンノース(以下、GKDMと略記する)の製造法に関する。GDP-フコースは、細菌・ウイルス等の感染防御、心血管障害への適用および免疫治療等に有用な複合糖

質の合成基質等として有用である。また、GKDMはGDP-フコースの製造のための中間体等として有用である。

【0002】

【従来の技術】

GDP-フコースの製造法に関しては、化学合成法[Carbohydrate Research, 242, 69 (1993)]が知られているが、立体選択性や基質の供給に難点がある。酵素を用いた方法[Agric. Biol. Chem, 48, 823 (1984)、特表平7-500248、W099/9180]では、高価な原料を使用したり、酵素の精製操作が煩雑であるため大量生産には不適當である。また、微生物の活性を利用した方法(W098/12343)も開発されており有用な方法であるが、工業的製法として用いるためには更なる改良が求められている。また、GDP-マンノースからGDP-フコースに至る生合成の初発酵素であるGDP-マンノース4, 6-デヒドラターゼ活性が最終産物であるGDP-フコースにより阻害を受けることが知られている[Biochim. Biophys. Acta, 117, 79 (1966)、FEBS Lett., 412, 126 (1997)]。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、GDP-フコースおよびGKDMの効率的な製造法を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を行い、GDP-フコースの前駆物質であるGKDMを生成蓄積させた後、蓄積したGKDMをGDP-フコースに転換することにより、GDP-フコースによるGDP-マンノース4, 6-デヒドラターゼ活性の阻害を回避することができ、効率的にGDP-フコースを生成させることができることを見出し本発明を完成するに至った。

【0005】

即ち、本発明は以下の(1)～(18)に関する。

(1) GKDMをGDP-フコースに変換する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源およびGKDMを水性媒体中

に存在せしめ、該水性媒体中でGDP-フコースを生成蓄積させ、該水性媒体中からGDP-フコースを採取することを特徴とするGDP-フコースの製造法。

【0006】

(2) GTPの前駆物質からGTPを生成する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、および糖とGTPからGKDMを生成する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、これらの酵素源、GTPの前駆物質および糖を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中でGKDMを生成蓄積させた後、GKDMをGDP-フコースに変換する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、蓄積したGKDMをGDP-フコースに変換することによりGDP-フコースを該水性媒体中に生成蓄積させ、該水性媒体中からGDP-フコースを採取することを特徴とするGDP-フコースの製造法。

【0007】

(3) GTPの前駆物質からGTPを生成する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、および糖とGTPからGKDMを生成する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、これらの酵素源、GTPの前駆物質および糖を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中でGKDMを生成蓄積させ、該水性媒体中からGKDMを採取することを特徴とするGKDMの製造法。

【0008】

(4) 培養液の処理物が、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液を遠心分離して得られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩砕処理物、該菌体の溶媒処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の蛋白質分画物、該菌体の固定化物あるいは該菌体より抽出して得られる酵素標品であることを特徴とする上記(1)、(2)または(3)の製造法。

【0009】

(5) GTPの前駆物質がグアニン、キサンチン、ヒポキサンチン、グアノシン、キサントシン、イノシン、グアノシン-5'-リン酸、キサントシン-5'

、ーリン酸、イノシン-5'ーリン酸である上記(2)または(3)の製造法。

(6) 糖がグルコース、フラクトース、マンノースから選ばれる糖である上記(2)または(3)の製造法。

【0010】

(7) GTPの前駆物質からGTPを生成する能力を有する微生物がコリネバクテリウム属に属する微生物から選ばれる微生物であることを特徴とする上記(2)または(3)の製造法。

(8) コリネバクテリウム属に属する微生物が、コリネバクテリウム・アンモニアゲネスであることを特徴とする上記(7)の製造法。

【0011】

(9) 糖とGTPからGKDMを生成する能力を有する微生物が、1または2種類以上の微生物より構成されることを特徴とする上記(2)または(3)の製造法。

(10) 微生物がエシェリヒア属およびコリネバクテリウム属に属する微生物から選ばれる1または2種類以上の微生物であることを特徴とする上記(9)の製造法。

【0012】

(11) エシェリヒア属に属する微生物がエシェリヒア・コリである上記(10)の製造法。

(12) コリネバクテリウム属に属する微生物が、コリネバクテリウム・アンモニアゲネスであることを特徴とする上記(10)の製造法。

(13) 糖とGTPからGKDMを生成する能力を有する微生物が、グルコキナーゼ(以下、g1kと略記する)、ホスホマンノムターゼ(以下、manBと略記する)、マンノースー1ーリン酸グアニリルトランスフェラーゼ(以下、manCと略記する)、ホスホグルコムターゼ(以下、pgmと略記する)、ホスホフラクトキナーゼ(以下、pfkと略記する)およびGDPーマンノース4,6ーデヒドラターゼ(以下、gmdと略記する)から選ばれる1つ以上の酵素の活性の強い微生物であることを特徴とする上記(2)または(3)の製造法。

【0013】

(14) 微生物が、g l kをコードする遺伝子、m a n Bをコードする遺伝子、m a n Cをコードする遺伝子、p g mをコードする遺伝子、p f kをコードする遺伝子およびg m dをコードする遺伝子から選ばれる1種類以上の遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有する1種類以上の微生物から構成されることを特徴とする上記(13)の製造法。

【0014】

(15) g l kをコードする遺伝子、m a n Bをコードする遺伝子、m a n Cをコードする遺伝子、p g mをコードする遺伝子、p f kをコードする遺伝子およびg m dをコードする遺伝子がエシェリヒア・コリ由来の遺伝子であることを特徴とする上記(14)の製造法。

(16) GKDMをGDPーフコースに変換する能力を有する微生物が、GKDMエピメラーゼ／レダクターゼ(以下、w c a Gと略記する)活性の強い微生物であることを特徴とする上記(1)または(2)の製造法。

【0015】

(17) 微生物がw c a Gをコードする遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有する微生物であることを特徴とする上記(16)の製造法。

(18) w c a Gをコードする遺伝子がエシェリヒア・コリ由来の遺伝子であることを特徴とする上記(17)の製造法。

【0016】

以下に本発明を詳細に説明する。

【0017】

【発明の実施の形態】

本発明で用いられるGTPの前駆物質からGTPを生成する能力を有する微生物としては、該能力を有する微生物であればいずれの微生物も用いることができ、例えばエシェリヒア属またはコリネバクテリウム属に属する微生物をあげることができる。

【0018】

エシェリヒア属に属する微生物としてはエシェリヒア・コリ等をあげることができる。

コリネバクテリウム属に属する微生物としてはコリネバクテリウム・アンモニアゲネス等をあげることができる。具体的には、*Corynebacterium ammoniagenes* ATCC21170等をあげることができる。

【0019】

本発明で用いられる糖とGTPからGKDMを生成する能力を有する微生物としては、糖とGTPからGKDMを生成する能力を有する微生物であればいずれの微生物も用いることができる。例えば、*glk*、*manB*、*manC*、*pgm*、*pfk*および*gmd*から選ばれる1種類以上の酵素の活性の強い微生物等が用いられる。

【0020】

具体的には、エシェリヒア属またはコリネバクテリウム属に属する微生物をあげることができ、好ましい具体例としては、エシェリヒア・コリまたはコリネバクテリウム・アンモニアゲネスをあげることができる。

また、*glk*、*manB*、*manC*、*pgm*、*pfk*および*gmd*から選ばれる1種類以上の酵素の活性を遺伝子組換え技術により増強した形質転換体を用いることもできる。該形質転換体の具体例として、エシェリヒア・コリ由来の*glk*遺伝子[J. Bacteriol., 179, 1298 (1997)]を含む組換え体DNA (pNK11)を保有するエシェリヒア・コリNM522株、エシェリヒア・コリ由来の*manB*遺伝子[J. Bacteriol., 178, 4885 (1996)]を含む組換え体DNA (pNK11)を保有するエシェリヒア・コリNM522株、エシェリヒア・コリ由来の*manC*遺伝子[J. Bacteriol., 178, 4885 (1996)]を含む組換え体DNA (pNK11)を保有するエシェリヒア・コリNM522株、エシェリヒア・コリ由来の*pgm*遺伝子[J. Bacteriol., 176, 5847 (1994)]を含む組換え体DNA (pNT55)を保有するエシェリヒア・コリNM522株(W098/12343)、エシェリヒア・コリ由来の*pfkB*遺伝子[Gene, 28, 337 (1984)]を含む組換え体DNA (pNT55)を保有するエシェリヒア・コリNM522株(W098/12343)およびエシェリヒア・コリ由来の*gmd*遺伝子[J. Bacteriol., 178, 4885 (1996)]

]を含む組換え体DNA (pGE19) を保有するエシェリヒア・コリNM52株等をあげることができる。

【0021】

微生物が、GTPの前駆物質からGTPを生成する能力および糖とGTPからGKDMを生成する能力を同時に有する場合には、該微生物を利用し、GTPの前駆物質と糖からGKDMを生成することができる。

また、1菌株中に糖とGTPからGKDMの生成に必要な活性の一部しか有していない微生物の場合、2種類以上の微生物を適宜組み合わせ、GKDMを生成することができる。

【0022】

本発明で用いられるGKDMをGDPーフコースに変換する能力を有する微生物としては、該変換活性を有する微生物であればいずれでも用いることができる。例えば、wcaG活性の強い微生物を用いることができる。

具体的には、エシェリヒア属またはコリネバクテリウム属に属する微生物、例えば、エシェリヒア・コリまたはコリネバクテリウム・アンモニアゲネス等をあげることができる。

【0023】

また、GKDMエピメラーゼ/レダクターゼの活性を遺伝子組換え技術により増強した形質転換体を用いることもできる。該形質転換体の具体例として、エシェリヒア・コリ由来のwcaG遺伝子[J. Bacteriol., 178, 4885 (1996)]を含む組換え体DNA (pGE8) を保有するエシェリヒア・コリNM522株等をあげることができる。

【0024】

上述の遺伝子組換え技術を用いるGDPーフコースおよびGKDMの製造において、微生物からのプラスミドDNAの単離精製、プラスミドDNAの制限酵素による切断、切断したDNA断片の単離精製、DNA断片の酵素的結合、組換え体DNAを用いた形質転換等、遺伝子組換えに関する種々の操作は公知の方法[例えば、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)(以下、モレキュラー・クローニング第2

版と略記する)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略記する)]に準じて行うことができる。また、ポリメラーゼ・チェイン・リアクション(以下、PCRと略記する)は公知の方法[PCR Protocols, Academic Press (1990)]に従って行うことができる。

【0025】

GDP-フコースまたはGKDMの生成に関与する遺伝子を宿主内で発現させるためには、該遺伝子を含むDNA断片を、制限酵素類あるいはPCRで該遺伝子を含む適当な長さのDNA断片とした後に、適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入し、次いで上記DNAを挿入した発現ベクターを、発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより達成できる。

【0026】

宿主細胞としては、細菌、酵母等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なものは染色体への組込が可能で、目的とするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

【0027】

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、遺伝子の発現ベクターは原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、目的とするDNA、転写終結配列、より構成された組換え体DNAであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、pKK223-3、pGEX-2T (いずれもアマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)、pSE280 (インビトロジェン社製)、pGEMEX-1 (プロメガ社製)、pQE-30 (キアゲン社製)、pET-3 (ノバジェン社製)、pKYP10 (特開昭58-110600)、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescriptII SK+ (ストラタジーン社製)、pBluescript II SK- (ストラタジーン社製)、pTrs30 [大腸菌JM109/pTrs30(FERM BP-5407)より調製]

、pTrs32[大腸菌JM109/pTrs32(FERM BP-5408)より調製]、pUC19[Gene, 33, 103 (1985)]、pSTV28(宝酒造社製)、pUC118(宝酒造社製)、pPAC31(W098/12343)等を例示することができる。

【0028】

プロモーターとしては、大腸菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター(P trp)、lacプロモーター(P l ac)、P_Lプロモーター、P_Rプロモーター、P_{SE}プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。またP trpを2つ直列させたプロモーター、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

【0029】

リボソーム結合配列であるシャイン-ダルガノ(Shine-Dalgarno)配列と開始コドンとの間を適当な距離(例えば6~18塩基)に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本発明の組換え体DNAにおいては、目的とするDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

【0030】

原核生物としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli W1485、Escherichia coli NM522、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium immari philum ATCC14068、Brevibacterium sacchar lyticum ATCC14066、Corynebacterium amm niagenes、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Coryn

ebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

【 0 0 3 1 】

組換え体DNAの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法(特開昭63-248394)、エレクトロポレーション法[Nucleic Acids Research, 16, 6127 (1988)]等をあげることができる。

【 0 0 3 2 】

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YE p13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等を用いることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MF α 1 プロモーター、CUP 1プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

【 0 0 3 3 】

宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベロミセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属、ピチア属、キャンディダ属等に属する酵母菌株をあげることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius、Pichia pastoris、Candida utilis等をあげることができる。

【 0 0 3 4 】

組換え体DNAの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法[Meth ds in Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA,

81, 4889 (1984)]、酢酸リチウム法[J. Bacteriol., 153, 163 (1983)]等をあげることができる。

【0035】

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含み、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

【0036】

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、シュクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体、およびその消化物等を用いることができる。

【0037】

無機物としては、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養等の好気的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常5時間～7日間である。培養中pHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

【0038】

また、培養中に必要に応じて、アンピシリンやクロラムフェニコール等の抗生物

質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

【0039】

本発明の製造において、2種類以上の微生物を用いる場合、該微生物をそれぞれ個別に培養し、該培養液を利用してもよいし、一つの培養器に同時に植菌し、混合培養した後、該培養液を利用してもよい。また、いずれかの微生物の培養中もしくは培養終了時に残りの微生物を植菌し、培養した後、該培養液を利用してもよい。

【0040】

該培養により得られた微生物の培養液および該培養液を種々処理した培養液の処理物を酵素源として用い、水性媒体中で本発明の製造に用いることができる。

培養液の処理物としては、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液を遠心分離して得られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩砕処理物、該菌体の溶媒処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の蛋白質分画物、該菌体の固定化物あるいは該菌体より抽出して得られる酵素標品などをあげることができる。

【0041】

本発明の製造法において用いられる微生物の量は、湿菌体として1～500g/lであり、好ましくは5～300g/lである。また、同時に2種類以上の微生物を用いて生成反応を行う場合には、水性媒体中の該微生物の全湿菌体量は2～500g/lであり、好ましくは10～400g/lである。

本発明の製造法において用いられるGTPの前駆物質としては、グアニン、キサンチン、ヒポキサンチン、グアノシン、キサントシン、イノシン、グアノシン-5'-リン酸、キサントシン-5'-リン酸、イノシン-5'-リン酸

等をあげることができる。該前駆物質は、純品および該前駆物質の塩ならびに夾雑物が反応を阻害しない限り、微生物により発酵生産された該前駆物質含有培養液および該培養液からの該前駆物質粗精製物を用いることができる。GTPの前駆物質は0.1 mM~1.0 M、好ましくは0.01~0.5 Mの濃度で用いられる。

【0042】

本発明の製造法において用いられる糖としては、グルコース、フラクトース、マンノースおよびこれらの誘導体等をあげることができる。該糖は純品を用いてもよいし、これらを含むもので、夾雑物が反応を阻害しないものであればいずれも用いることができる。糖は反応開始時に一括して添加してもよいし、あるいは反応中分割して、あるいは連続的に添加することもでき、0.1 mMから2.0 Mの濃度で用いられる。

【0043】

本発明の製造法において、必要に応じてエネルギー供与体、補酵素、リン酸イオン、マグネシウムイオン、フィチン酸等のキレート剤、界面活性剤および有機溶媒を添加してもよい。

エネルギー供与体としては、生成を促すものであればいずれも用いることができるが、グルコース、フラクトース、シュクロース、ラクトース、マルトース、マンニトール、ソルビトール等の炭水化物、ピルビン酸、乳酸、酢酸等の有機酸、グリシン、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸等のアミノ酸、糖蜜、澱粉加水分解物等をあげることができ、1.0 mM~2.0 Mの濃度で用いられる。

【0044】

リン酸イオンとしては、正リン酸、ピロリン酸、トリポリリン酸、ポリリン酸、メタリン酸、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、リン酸一ナトリウム、リン酸二ナトリウム等の無機リン酸塩等をあげることができ、1.0 mM~1.0 Mの濃度で用いることができる。

マグネシウムイオンとしては、硫酸マグネシウム、硝酸マグネシウム、塩化マグネシウム等の無機マグネシウム塩、クエン酸マグネシウム等の有機マグネ

シウム塩等をあげることができ、通常 1～100 mM の濃度で用いられる。

【0045】

界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・オクタデシルアミン（例えばナイミン S-215、日本油脂社製）などの非イオン界面活性剤、セチルトリメチルアンモニウム・ブロマイドやアルキルジメチル・ベンジルアンモニウムクロライド（例えばカチオン F2-40E、日本油脂社製）などのカチオン系界面活性剤、ラウロイル・ザルコシネートなどのアニオン系界面活性剤、アルキルジメチルアミン（例えば三級アミン FB、日本油脂社製）などの三級アミン類など、生成を促進するものであればいずれでもよく、1種または数種を混合して使用することもできる。界面活性剤は、通常 0.1～50 g/l の濃度で用いられる。

【0046】

有機溶剤としては、キシレン、トルエン、脂肪族アルコール、アセトン、酢酸エチルなどが挙げられ、通常 0.1～50 ml/l の濃度で用いられる。

本発明の製造法において用いられる水性媒体としては、水、リン酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ほう酸塩、クエン酸塩、トリスなどの緩衝液、メタノール、エタノールなどのアルコール類、酢酸エチルなどのエステル類、アセトンなどのケトン類、アセトアミドなどのアミド類などをあげることができる。また、微生物の培養液を水性媒体として用いることができる。

【0047】

本発明の製造法は水性媒体中、pH 5～10、好ましくは pH 6～8、20～50℃ の条件で 1～96 時間行う。

水性媒体中に生成した GDP-フコースおよび GKDM の定量は W098/12343 に記載された方法に準じて HPLC などを用いて行うことができる。

反応液中に生成した GDP-フコースおよび GKDM の採取は、活性炭やイオン交換樹脂などを用いる通常の方法 [Carbohydrate Research, 242, 69 (1993)] などによって行うことができる。

【0048】

以下に本発明の実施例を示す。

【0049】

【実施例】

実施例 1. *g l k*、*m a n B*、*m a n C*、*p g m*および*p f k B*発現株の造成

配列番号 1 記載の塩基配列を有する DNA プライマーと配列番号 2 記載の塩基配列を有する DNA プライマーをパーセプティブ・バイオシステムズ社製 8905 型 DNA 合成機を用いて合成した。

【0 0 5 0】

上記合成 DNA をプライマーとして用い、*g l k* 遺伝子を含むプラスミド *p N T 4 6* (W098/12343) DNA を鋳型として PCR を行った。PCR は *p N T 4 6 D N A* 1 n g、プライマー各 0. 5 μ M、*P f u* DNA ポリメラーゼ (ストラタジーン社製) 2. 5 u n i t s、*P f u* DNA ポリメラーゼ用 $\times 1 0$ 緩衝液 (ストラタジーン社製) 4 μ l、deoxyNTP 各 2 0 0 μ M を含む反応液 4 0 μ l を用い、9 4 $^{\circ}$ C - 1 分、4 2 $^{\circ}$ C - 2 分、7 2 $^{\circ}$ C - 3 分の工程を 3 0 回繰り返すことにより行った。

【0 0 5 1】

該反応液の 1 / 1 0 量をアガロースゲル電気泳動し、目的の断片が増幅していることを確認後、残りの反応液と等量の TE [1 0 m M T r i s - H C l (p H 8. 0)、1 m M E D T A] 飽和フェノール / クロロホルム (1 v o l / 1 v o l) を添加し、混合した。

該混合液を遠心分離後、得られた上層に 2 倍容量の冷エタノールを加えて混合し、- 8 0 $^{\circ}$ C に 3 0 分間放置した。該放置液を遠心分離し DNA の沈殿を得た。

【0 0 5 2】

該 DNA の沈殿を 2 0 μ l の TE に溶解した。該溶解液 5 μ l を用い、DNA を制限酵素 B g 1 II および S a 1 I で切断し、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離した後、ジーンクリーン II キットにより 1. 3 k b の断片を回収した。

m a n B および *m a n C* 発現プラスミドである *p N K 7* (W098/12343) DNA 0. 2 μ g を制限酵素 B a m H I および S a 1 I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 8. 2 k b の断片を回収した。

【0 0 5 3】

該 1.3 kb および 8.2 kb の断片をライゲーションキットを用いて、16℃、16時間、連結反応を行った。該連結反応液を用いて *Escherichia coli* NM522 株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む LB 寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、g1k、manB、manC 発現プラスミドである pNK11 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（第 1 図）。

【0054】

上記で得られたプラスミド pNK11 を用いて *Escherichia coli* NM522/pNT55 株 (W098/12343) を公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ およびクロラムフェニコール 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む LB 寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。生育してきた形質転換体を選択することにより、g1k、manB、manC、pgm および pfkB を同時に発現する株である *Escherichia coli* NM522/pNK11/pNT55 を得た。

【0055】

実施例 2. *Escherichia coli* 由来の gmd を発現する株の造成

Escherichia coli W3110 (ATCC27325) 株をカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載の方法により培養後、該微生物の染色体 DNA を単離精製した。

パーセプティブ・バイオシステムズ社製 8905 型 DNA 合成機を用いて合成した配列番号 3 および 4 に記載の塩基配列をそれぞれ有する DNA をプライマーとして用いて、*Escherichia coli* W3110 (ATCC13027) 株の染色体 DNA 0.1 μg を鋳型として実施例 1 記載の方法に従って PCR 反応を行った。

【0056】

該反応液の 1/10 量をアガロースゲル電気泳動し、目的の断片が増幅していることを確認後、残りの反応液と等量の TE 飽和フェノール/クロロホルムを添加し、混合した。

該混合液を遠心分離後、得られた上層に 2 倍容量の冷エタノールを加えて混合し、-80℃に 30 分間放置した。該放置液を遠心分離し DNA の沈殿を得た。

【 0 0 5 7 】

該 DNA の沈殿を 2 0 μ l の TE に溶解した。該溶解液 5 μ l を用い、DNA を制限酵素 H i n d III および X b a I で切断し、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離した後、ジーンクリーン II キットにより 1. 1 k b の DNA 断片を回収した。

パーセプティブ・バイオシステムズ社製 8905 型 DNA 合成機を用いて合成した配列番号 5 および 6 に記載の塩基配列をそれぞれ有する DNA をプライマーとして用いて、trp プロモーターを含むプラスミドである p NT 5 4 (W098/12343) の DNA を鋳型として実施例 1 記載の方法に従って PCR 反応を行った。

【 0 0 5 8 】

該反応液の 1 / 1 0 量をアガロースゲル電気泳動し、目的の断片が増幅していることを確認後、残りの反応液と等量の TE 飽和フェノール / クロロホルムを添加し、混合した。

該混合液を遠心分離後、得られた上層に 2 倍容量の冷エタノールを加えて混合し、- 8 0 $^{\circ}$ C に 3 0 分間放置した。該放置液を遠心分離し DNA の沈殿を得、該 DNA の沈殿を 2 0 μ l の TE に溶解した。

【 0 0 5 9 】

該溶解液 5 μ l を用い、DNA を制限酵素 E c o R I および X b a I で切断し、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離した後、同様に 0. 4 k b の DNA 断片を回収した。

pBluescript II SK+ DNA 0. 2 μ g を制限酵素 E c o R I および H i n d II I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 3. 0 k b の DNA 断片を回収した。

【 0 0 6 0 】

該 1. 1 k b、0. 4 k b および 5. 5 k b の断片をライゲーションキットを用いて、1 6 $^{\circ}$ C、1 6 時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いて Escherichia coli NM522 株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン 5 0 μ g / m l を含む LB 寒天培地に塗布後、3 0 $^{\circ}$ C で一晚培養した。

【0061】

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、発現プラスミドである p G E 1 9 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（第2図）。

実施例3. エシェリヒア・コリ由来の w c a G 発現株の造成

パーセプティブ・バイオシステムズ社製8905型DNA合成機を用いて合成した配列番号7および8に記載の塩基配列をそれぞれ有するDNAをプライマーとして用いて、Escherichia coli W3110(ATCC13027)株の染色体DNAを鋳型として実施例1記載の方法に従ってPCR反応を行った。

【0062】

該反応液の1/10量をアガロースゲル電気泳動し、目的の断片が増幅していることを確認後、残りの反応液と等量のTE飽和フェノール/クロロホルムを添加し、混合した。

該混合液を遠心分離後、得られた上層に2倍容量の冷エタノールを加えて混合し、-80℃に30分間放置した。該放置液を遠心分離しDNAの沈殿を得、該DNAの沈殿を20μlのTEに溶解した。該溶解液5μlを用い、DNAを制限酵素C l a IおよびX h o Iで切断し、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離した後、ジーンクリーンIIキットにより1.0kbのDNA断片を回収した。

【0063】

p P A C 3 1 DNA 0.2μgを制限酵素C l a IおよびS a l Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に5.2kbのDNA断片を回収した。

該1.0kbおよび5.2kbの断片をライゲーションキットを用いて、16℃、16時間、連結反応を行った。

【0064】

該連結反応液を用いてEscherichia coli NM522株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50μg/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、発現プラスミドである pGE8 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（第3図）。

【0065】

実施例4. GKDMの生産

実施例1で得られた *Escherichia coli* NM522/pNK11/pNT55株をアンピシリン $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ およびクロラムフェニコール $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB培地 125 ml の入った1L容バッフル付き三角フラスコに接種し、 28°C で 220 rpm の条件で17時間培養した。該培養液 125 ml をグルコース $10 \text{ g}/\text{l}$ 、バクトトリプトン（ディフコ社製） $1.2 \text{ g}/\text{l}$ 、酵母エキス（ディフコ社製） $2.4 \text{ g}/\text{l}$ 、 KH_2PO_4 $2.3 \text{ g}/\text{l}$ 、 K_2HPO_4 $12.5 \text{ g}/\text{l}$ 、アンピシリン $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ の組成からなる液体培地（pH無調整） 2.5 L の入った5L容培養槽に接種し、 600 rpm 、通気量 $2.5 \text{ L}/\text{分}$ の条件で 30°C で4時間培養した後、さらに 40°C で3時間培養を行った。培養中、28%アンモニア水を用いて、培養液のpHを7.0に維持した。また、培養途中で必要に応じてグルコースを添加した。該培養液を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20°C で保存することができ、使用前に解凍して用いることができた。

【0066】

実施例2で得られた *Escherichia coli* NM522/pGE19株をアンピシリン $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB培地 125 ml の入った1L容バッフル付き三角フラスコに接種し、 28°C で 220 rpm の条件で17時間培養した。該培養液 125 ml をグルコース $10 \text{ g}/\text{l}$ 、バクトトリプトン（ディフコ社製） $1.2 \text{ g}/\text{l}$ 、酵母エキス（ディフコ社製） $2.4 \text{ g}/\text{l}$ 、 KH_2PO_4 $2.3 \text{ g}/\text{l}$ 、 K_2HPO_4 $12.5 \text{ g}/\text{l}$ 、アンピシリン $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ の組成からなる液体培地（pH無調整） 2.5 L の入った5L容培養槽に接種し、 37°C で6時間、 600 rpm 、通気量 $2.5 \text{ L}/\text{分}$ の条件で培養を行った。培養中、28%アンモニア水を用いて、培養液のpHを7.0に維持した。また、培養途中で必要に応じてグルコースを添加した。該培養液を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20°C で保存することができ、使用前に解凍して用いることができた。

【0067】

Corynebacterium ammoniagenes ATCC21170株をグルコース 50 g/l、ポリペプトン（日本製薬社製）10 g/l、酵母エキス（オリエンタル酵母社製）10 g/l、尿素 5 g/l、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g/l、 KH_2PO_4 1 g/l、 K_2HPO_4 3 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/l、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/l、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/l、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/l、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mg/l、L-システイン 20 mg/l、D-パントテン酸カルシウム 10 mg/l、ビタミンB1 5 mg/l、ニコチン酸 5 mg/l、およびビオチン 30 μg /l（10N NaOHでpH7.2に調整）の組成からなる液体培地 25 ml の入った 300 ml 容バッフル付き三角フラスコに接種し、28℃、220 rpm の条件で、24時間培養した。

【0068】

該培養液 20 ml を上記と同一組成の液体培地 250 ml の入った 2 L 容バッフル付き三角フラスコに接種し、28℃、220 rpm の条件で、24時間培養した。得られた培養液を種培養液として用いた。

該種培養液 250 ml を、グルコース 150 g/l、肉エキス（極東製薬社製）5 g/l、 KH_2PO_4 10 g/l、 K_2HPO_4 10 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 g/l、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/l、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 mg/l、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/l、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mg/l（別殺菌）、 β -アラニン 15 mg/l（別殺菌）、L-システイン 20 mg/l、ビオチン 100 μg /l、尿素 2 g/l、およびビタミンB1 5 mg/l（別殺菌）（10N NaOHでpH7.2に調整）の組成からなる液体培地 2.25 L の入った 5 L 容培養槽に接種し、32℃、600 rpm、通気量 2.5 L/分の条件で24時間培養を行った。培養中、28%アンモニア水を用いて、培養液のpHを6.8に維持した。

【0069】

該培養液を遠心分離し、湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて-20℃で保存することができ、使用前に解凍して用いることができた。

上記 Escherichia coli NM522/pNK11/pNT55株湿菌体 25 g/l、Escherichia

coli NM522/pGE19株湿菌体 15 g/l、Corynebacterium ammoniagenes ATCC21170株湿菌体 150 g/l、フラクトース 60 g/l、マンノース 30 g/l、GMP 20 g/l、 KH_2PO_4 25 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g/l、フィチン酸 5 g/l、ナイミーン S-215 4 g/l およびキシレン 10 ml/l の組成からなる反応液 30 ml を 200 ml 容ビーカーに入れ、該反応液をマグネティック・スターラーを用いて攪拌 (900 rpm) し、32℃で12時間反応を行った。反応中、4N NaOHを用いて、該反応液のpHを7.2に維持し、必要に応じてフラクトース、 KH_2PO_4 を添加した。

【0070】

反応終了後、反応生成物をHPLCを用いて分析し、反応液中に18.6 g/l (29.4 mM) のGKDM (2Na塩) が生成蓄積していることを確認した。

【0071】

実施例5. GDP-フコースの生産

実施例1で得られたEscherichia coli NM522/pNK11/pNT55株を実施例4記載の方法により培養し、遠心分離により湿菌体を取得した。

【0072】

実施例2で得られたEscherichia coli NM522/pGE19株を実施例4記載の方法により培養し、遠心分離により湿菌体を取得した。

実施例3で得られたEscherichia coli NM522/pGE8株を実施例4記載のEscherichia coli NM522/pNK11/pNT55株と同様の方法により培養し、遠心分離により湿菌体を取得した。

【0073】

Corynebacterium ammoniagenes ATCC21170株を実施例4記載の方法により培養し、遠心分離により湿菌体を取得した。

該湿菌体は必要に応じて-20℃で保存することができ、使用前に解凍して用いることができた。

上記Escherichia coli NM522/pNK11/pNT55株湿菌体 25 g/l、Escherichia coli NM522/pGE19株湿菌体 15 g/l、Corynebacterium ammoniagenes ATCC211

70株湿菌体 150 g/l、フラクトース 60 g/l、マンノース 30 g/l、GMP 30 g/l、 KH_2PO_4 25 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g/l、フィチン酸 5 g/l、ナイミーン S-215 4 g/l およびキシレン 10 ml/l の組成からなる反応液 30 ml を 200 ml 容ビーカーに入れ、該反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌 (900 rpm) し、32℃で12時間反応を行った。反応12時間目に、Escherichia coli NM522/pGE8株湿菌体を15 g/l となるように添加して、さらに10時間反応を続けた。反応中、4N NaOHを用いて、該反応液のpHを7.2に維持し、必要に応じてフラクトースおよび KH_2PO_4 を添加した。

【0074】

反応終了後、反応生成物をHPLCにより分析し、反応液中に14.0 g/l のGDP-フコースが生成蓄積していることを確認した。

Escherichia coli NM522/pGE8株湿菌体 (15 g/l) を反応開始時に添加して22時間反応を行った場合のGDP-フコース (2Na塩) の蓄積量は3.7 g/l (5.9 mM) であった。

【0075】

【発明の効果】

本発明により、GDP-フコースおよびGKDMを効率的に製造できる。

【0076】

【配列フリーテキスト】

配列番号1—人工配列の説明：合成DNA

配列番号2—人工配列の説明：合成DNA

配列番号3—人工配列の説明：合成DNA

配列番号4—人工配列の説明：合成DNA

配列番号5—人工配列の説明：合成DNA

配列番号6—人工配列の説明：合成DNA

配列番号7—人工配列の説明：合成DNA

配列番号8—人工配列の説明：合成DNA

【 0 0 7 7 】

【配列表】

Sequence Listing

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> PROCESS FOR PRODUCING GDP-FUCOSE

<130> H11-0781J2

<140>

<141>

<160> 8

<170> PatentIn Ver.2.0

【 0 0 7 8 】

<210> 1

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 1

ccgcaagatc tcgtaaaaag ggtatcgata agc

3

3

【 0 0 7 9 】

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 2

gagctgactg ggttgaaggc

2

0

【0 0 8 0】

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 3

gaatctagaa tgtcaaaagt cgctctc

2

7

【0 0 8 1】

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 4

ctcaagctta tgactccagc gcgat

2

5

【0 0 8 2】

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 5

caagaattct catgtttgac agct

2

4

【 0 0 8 3 】

<210> 6

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 6

cattctagac ctccttaatt cgcgaaaatg gatcgatacc ctttttac

4

8

【 0 0 8 4 】

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 7

gtcatcgata tgagtaaaca acgagtt

27

【 0 0 8 5 】

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 8

ataaactcga gagagacaag cggag

25

【図面の簡単な説明】

【図 1】 g l k、m a n B、m a n C 発現プラスミド p N K 1 1 の造成工程を示す。

【図 2】 g m d 発現プラスミド p G E 1 9 の造成工程を示す。

【図 3】 w c a G 発現プラスミド p G E 8 の造成工程を示す。

【符号の説明】

A m p^r : アンピシリン耐性遺伝子

P_L : P_L プロモーター

P_{lac} : l a c プロモーター

P_{trp} : t r p プロモーター

c I 8 5 7 : c I 8 5 7 リプレッサー

g l k : グルコキナーゼ遺伝子

m a n B : ホスホマンノムターゼ遺伝子

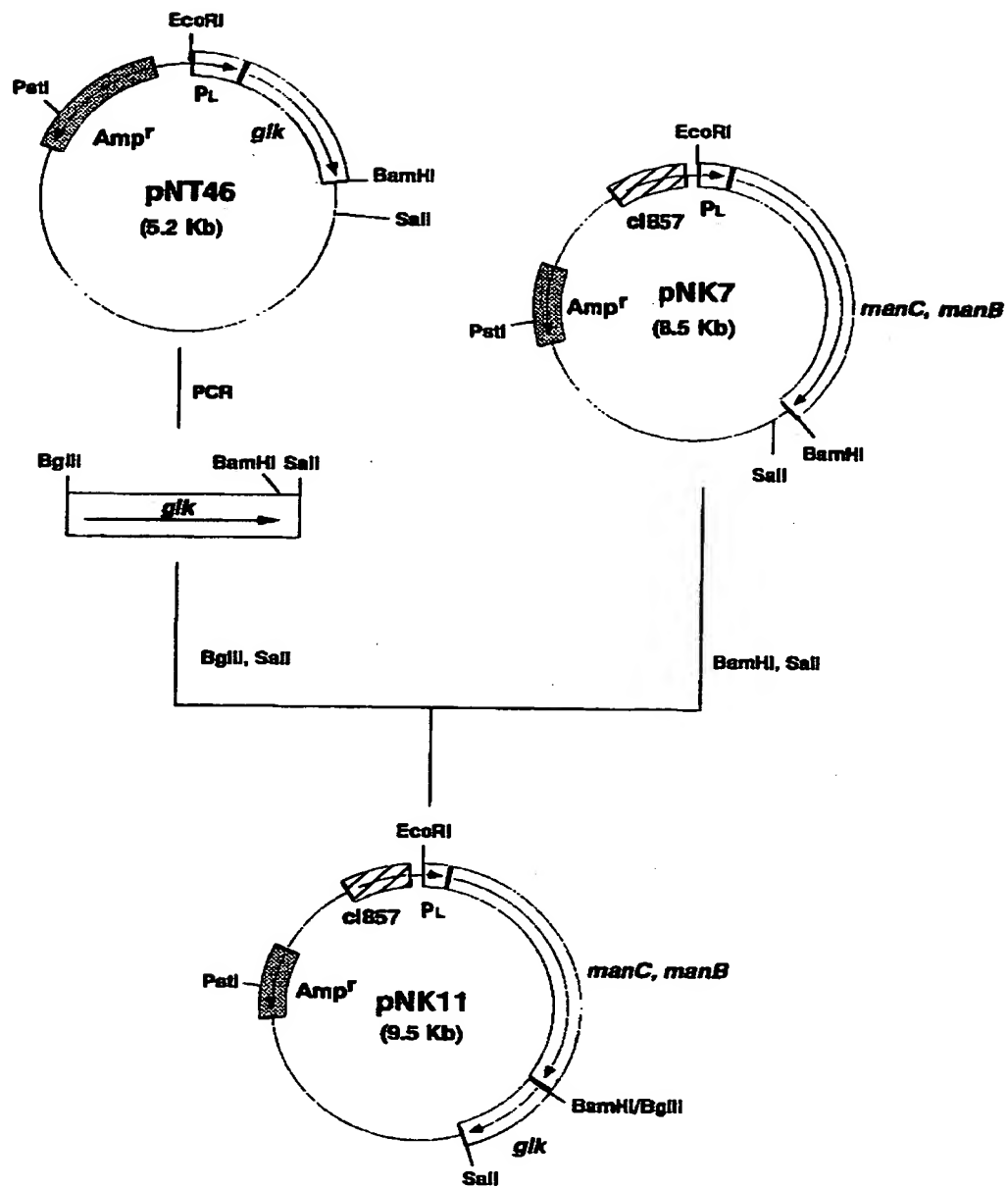
m a n C : マンノース-1-リン酸グアニリルトランスフェラーゼ遺伝子

g m d : G D P-マンノース 4, 6-デヒドラターゼ遺伝子

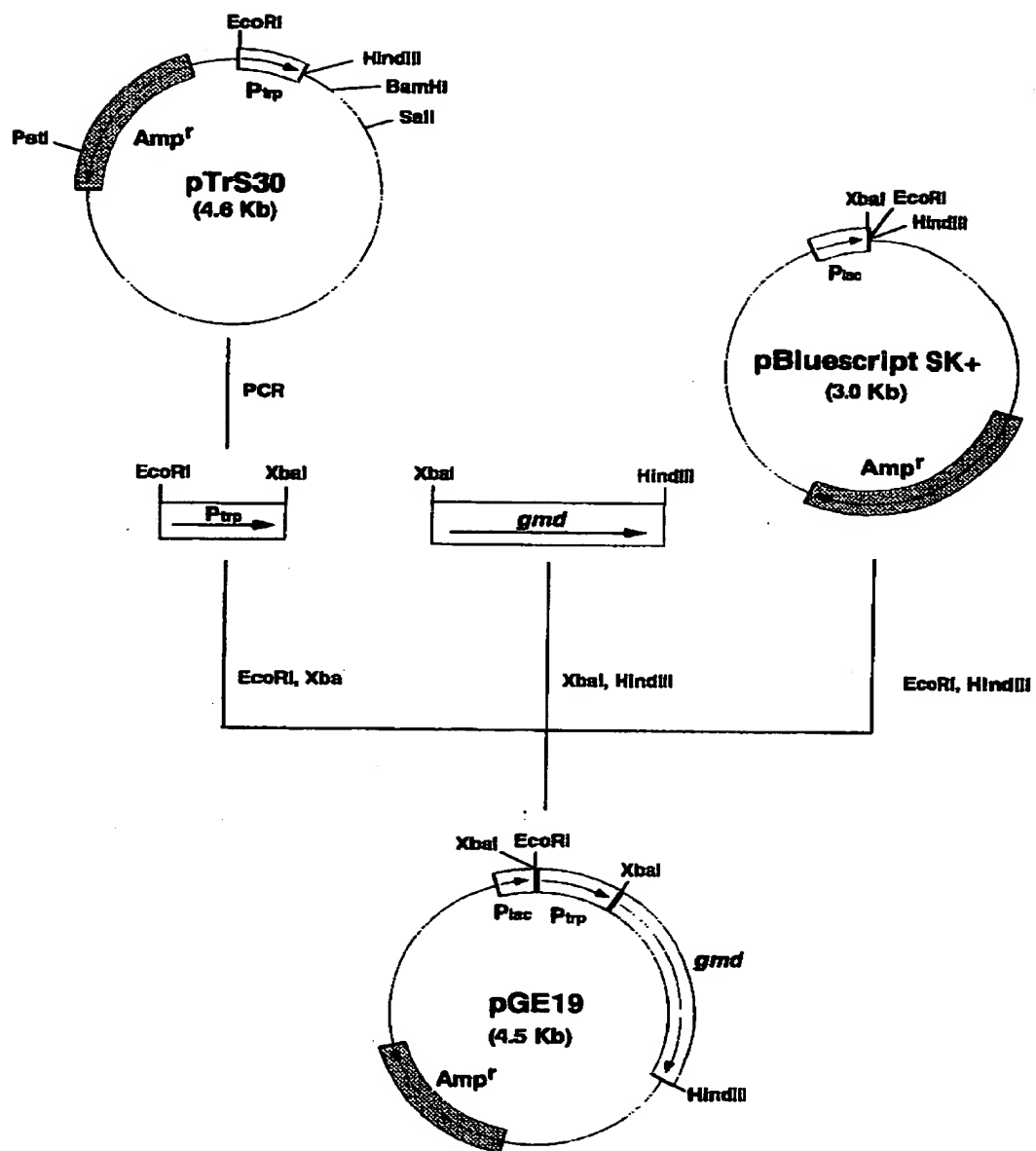
w c a G : G K D M エピメラーゼ/レダクターゼ遺伝子

【書類名】 図面

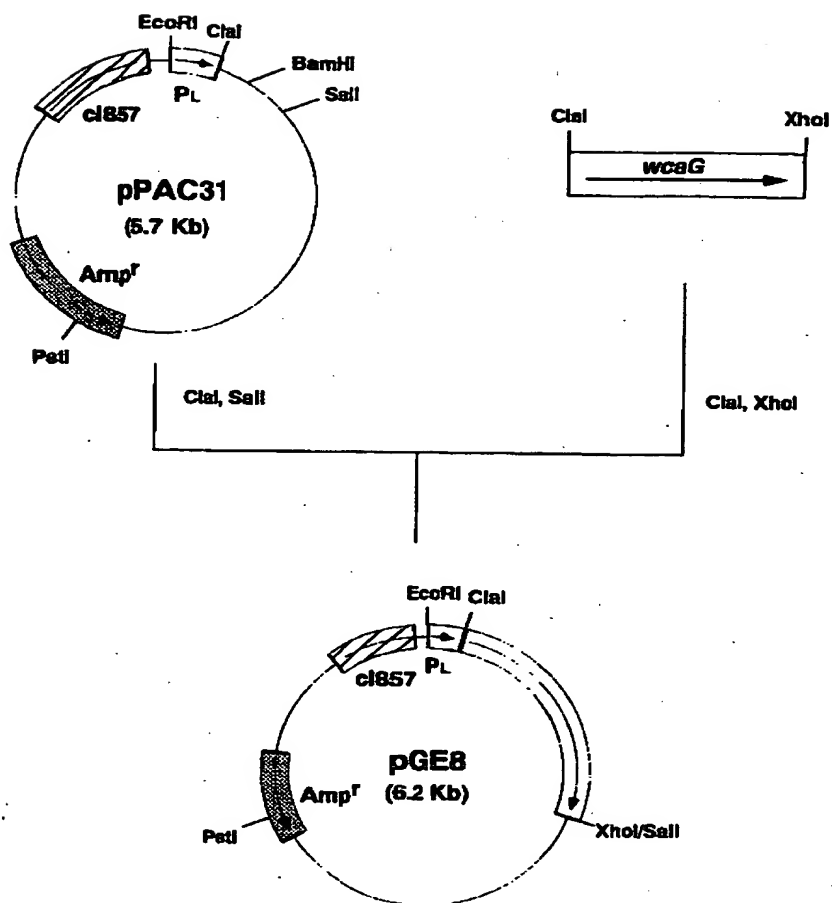
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

本発明は、細菌・ウイルス等の感染防御、心血管障害への適用および免疫治療等に有用な複合糖質の合成基質等として有用なGDP-フコースおよびその中間体であるGDP-4-ケト-6-デオキシマンノース（以下、GKDMと略記する）の製造法を提供する。

【解決手段】

GKDMをGDP-フコースに変換する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源およびGKDMを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中でGDP-フコースを生成蓄積させ、該水性媒体中からGDP-フコースを採取する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 1 0 2 9]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 6 日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区大手町 1 丁目 6 番 1 号

氏 名 協和醗酵工業株式会社